

УДК 543.422: 543.84: 547.992.2: 631.41

МЕТРОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ АНАЛИЗА ГУМИНОВЫХ КИСЛОТ

*В.Д.Тихова, В.П.Фадеева, М.М.Шакиров, Н.В.Юдина**
 Новосибирский институт органической химии им. Н.Н.Ворожцова СО РАН
 г.Новосибирск
 tikhova@nioch.nsc.ru
 *Институт химии нефти СО РАН
 Томск

Поступила в редакцию 24 августа 2004 г.

Проведена оценка метрологических характеристик таких методов исследования гуминовых кислот, как элементный CHN анализ, термический анализ, фрагментный анализ с использованием спектроскопии ЯМР ^{13}C . В результате исследований установлены параметры внутрилабораторной прецизионности и погрешности для всех упомянутых методов. Полученные данные позволяют оценивать достоверность различий между гуминовыми кислотами, при выделении которых допущены некоторые отклонения от стандартной методики, а также между гуминовыми кислотами различного генезиса.

Тихова Вера Дмитриевна – кандидат химических наук, научный сотрудник лаборатории микроанализа НИОХ СО РАН.
 Область научных интересов - органический элементный анализ, ЯМР спектроскопия гуминовых кислот.
 Автор 27 публикаций.

Фадеева Валентина Павловна – доктор химических наук, старший научный сотрудник, заведующая лабораторией микроанализа НИОХ СО РАН.
 Область научных интересов - органический элементный и функциональный анализ.
 Автор более 90 публикаций.

Шакиров Махмут Минахметович – старший научный сотрудник лаборатории физических методов исследования НИОХ СО РАН.
 Область научных интересов - ЯМР спектроскопия.
 Автор более 150 публикаций.

Юдина Наталья Васильевна – кандидат технических наук, старший научный сотрудник лаборатории реологии нефти ИХН СО РАН
 Автор около 50 публикаций.

Гуминовые кислоты (ГК), выделенные из разнообразных природных объектов (углей, торфов, почв, сапропелей), представляют собой необычайно сложный объект анализа. Совокупность таких факторов, как нестехиометричность состава, нерегулярность строения, гетерогенность структурных элементов, полидисперсность обуславливает разнообразные проблемы при анализе этих высокомолекулярных азотсодержащих поликарбонновых оксикислот.

В работах [1-4] нами предложена комплексная методическая основа для анализа гуминовых кислот почв, включающая элементный и термический анализ, ИК и ЯМР спектроскопию. Особенностью ее является сочетание традиционных методик анализа ГК с ЯМР спектроскопией. Каждый из упомянутых методов имеет свои погрешности при анализе индивидуальных органических веществ, но специфика гуминовых кислот требует более тщательного подхода к их оценке.

Как отмечается в литературе [5], изменчивость состава ГК связана со следующими причинами:

1. изменчивость почв и гумусовых веществ в пространстве и времени;
2. различия приемов выделения ГВ из почвы;
3. ошибки при подготовке пробы к анализу и в ходе самого анализа.

Необходимо сразу принять во внимание, что

под словом «ошибки» в данном литературном источнике подразумеваются именно погрешности, а не выполненные неправильно те или иные стадии выделения и анализа ГК. Как правило, в большинстве работ, проводимых специалистами-исследователями торфа, угля или почв, анализируются различия ГК в зависимости от климатических или иных условий формирования, причем выводы делаются на основании результатов элементного или иного анализа без указания соответствующих доверительных интервалов, в которых могут изменяться эти результаты. Однако, для того, чтобы выявить достоверность таких различий, необходимо, прежде всего, выяснить, насколько значимы погрешности, обусловленные различиями в процессе выделения и анализа гуминовых кислот.

Экспериментальная часть

Для исследований был использован торф низинный Таганского месторождения Томской области с высокой степенью разложения ($R = 30\%$) и зольностью ($25,5\%$) древесного ботанического состава.

Были проведены следующие серии экспериментов с ГК торфа:

1. анализ одного из образцов ГК низинного торфа всеми вышеупомянутыми методами для оценки внутрилабораторной прецизионности и погрешности в ходе самого анализа;

2. анализ пяти образцов ГК, выделенных из низинного торфа параллельно по стандартной методике для оценки воспроизводимости состава ГК при одинаковых условиях выделения (по данным элементного анализа и спектроскопии ЯМР ^{13}C);

3. анализ ГК, выделенных из низинного торфа с использованием различных вариантов методик, для оценки зависимости состава ГК от условий выделения.

В каждой серии:

- был определен элементный состав ГК.

Определение углерода, водорода и азота проводили на элементном анализаторе фирмы Carlo Erba mod. 1106 и классическим методом определения C, H в органических веществах.

- записаны ИК спектры.

ИК-спектры записывали на ИК-фурье-спектрометре Vector-22 фирмы Bruker в таблетках с KBr 1:150 во всем интервале значений частоты от 400 см^{-1} до 4000 см^{-1} .

- определены потери массы и термические эффекты при нагревании до 1000°C .

Термический анализ проводили на дериватог-

рафе Paulik, Paulik & Erdey в платиновом тигле, в атмосфере воздуха при нагревании от 20 до 1000°C со скоростью $5^\circ\text{C}/\text{мин}$. Чувствительность ТГ - 100 мг , ДТГ - $1/3$, ДТА - $1/3$.

- записаны спектры ЯМР ^{13}C .

Для получения спектров ЯМР 50 мг образца ГК растворяли в $0,5\text{ мл}$ $0,5\text{M NaOH}/\text{D}_2\text{O}$ и помещали в ампулу с внешним диаметром 5 мм . Спектры ^{13}C ЯМР были получены на спектрометре DRX-500 фирмы Bruker на частоте $125,76\text{ МГц}$. Для исключения ядерного эффекта Оверхаузера запись спектров ЯМР ^{13}C проводили с подавлением протонов в режиме INVGATE. В качестве внешнего стандарта использовали тетраметилсилан (ТМС). Спектры регистрировали с задержкой 1 с между импульсами.

Обсуждение результатов

Оценка погрешностей при выполнении анализа

Всеми вышеупомянутыми методами был исследован образец ГК, выделенный из низинного торфа по стандартной методике [6], для оценки внутрилабораторной прецизионности и случайной составляющей погрешности результатов в ходе самого анализа.

Элементный состав гуминовых кислот был определен с использованием методики, метрологически аттестованной Уральским НИИ метрологии [7]. Метрологическая оценка этой методики проводилась по выборке результатов, состоящей из 50 определений углерода, водорода и азота в стандартных образцах и 25 органических веществ различного элементного состава и строения. Было показано, что результаты анализа принадлежат к нормальному распределению, а систематическая погрешность не значима. Наличие минеральных компонентов в анализируемых образцах (зольность) не влияет на результаты определения углерода, водорода и азота при использовании этой методики [8]. Результаты определения элементного состава ГК и их статистическая обработка представлены в табл. 1.

Для метода элементного анализа сходимость и внутрилабораторная прецизионность результатов определения были оценены соответственно величиной стандартного отклонения единичного определения (S_n) и стандартного отклонения средней величины ($S_{\bar{n}}$) по всем определяемым элементам. Максимальное относительное стандартное отклонение – $2,6\%$ для азота, минимальное – $0,4\%$ для углерода, что не превышает указанного в методике и подтверждает пригодность данной методики для анализа ГК.

Таблица 1

Сходимость и внутрилабораторная прецизионность результатов анализа при определении элементного состава одного образца ГК торфа

Дата	C, мас. %	H, мас. %	N, мас. %
23.10.03	47,62	4,46	2,75
	48,39	4,47	3,17
	48,29	4,44	3,09
	48,50	4,69	2,91
	48,37	4,70	3,11
	48,53	4,61	3,03
среднее	48,28	4,56	3,01
S_n	0,34	0,12	0,15
24.10.03	47,97	4,43	3,08
	47,81	4,47	3,05
	48,32	4,64	3,11
	47,99	4,38	3,01
	47,90	4,58	3,01
среднее	48,00	4,50	3,05
S_n	0,19	0,10	0,04
20.11.03	48,13	4,46	3,06
	48,19	4,55	3,05
	48,03	4,60	2,99
	47,98	4,54	3,09
	48,19	4,61	3,01
среднее	48,10	4,55	3,04
S_n	0,10	0,06	0,04
$S_{n \text{ среднего}}$	0,21	0,09	0,08
$S_r, \%$	0,4	1,9	2,6
Довер.интервал $X \pm tS_n; n=15,$ $p=0,95, t=2,1$	$48,12 \pm 0,44$	$4,54 \pm 0,19$	$3,03 \pm 0,17$

Для вычисления границ доверительного интервала для произвольной вероятности применя-

ли t -критерий, поскольку число измерений менее 30, а их генеральная совокупность подчиняется закону нормального распределения. Значение измеряемой величины записывали как $X \pm tS_n$.

Была проведена запись ИК спектров 5 таблеток, приготовленных в стандартных условиях из 1 мг одного и того же образца ГК и 150 мг КВг. Значимых различий в ИК спектрах, записанных для этих пяти таблеток, не выявлено. Если нормировать ИК спектры по одной из полос, то они совпадают в пределах инструментальной погрешности ИК-спектрометра. Следует отметить, что здесь и далее ИК спектроскопия используется лишь для качественного анализа.

Впервые была проведена статистическая оценка результатов термогравиметрического анализа. Результаты представлены в табл.2. Показано, что максимальное $S_r = 7,1\%$ проявляется в начале разложения (20-100°C) при потере образцом гигроскопической и кристаллизационной воды, количество которой в ГК может зависеть от разных причин, в том числе от атмосферной влажности [9]. Минимальное $S_r = 1,1\%$ - для интервала 400-500°C. Стабильность потерь массы в этом интервале можно объяснить устойчивостью и постоянством состава разлагающихся в этих условиях фрагментов ГК. Однако, с другой стороны, абсолютные стандартные отклонения S_n для всех диапазонов значимо не отличаются друг от друга, поэтому отличие относительных величин S_r может быть обусловлено только лишь значениями самой потери массы, и чем она меньше, тем больше S_r . Были определены доверительные интервалы, в которых изменяются потери массы ГК при различных диапазонах температур для $P = 0,95$ и $n = 5$.

Таблица 2

Внутрилабораторная прецизионность определения потери массы образца ГК при термогравиметрическом анализе

Интервал температур, °C	Потеря массы (Δm), %					Δm средняя	S_n	$S_r, \%$	Доверительный интервал, $n=5, p=0,95, t=2,78$
	1	2	3	4	5				
20-100	6,2	5,6	5,2	5,2	5,7	5,6	0,4	7,1	$\pm 1,1$
100-200	11,3	11,7	11,3	11,5	11,6	11,5	0,2	1,7	$\pm 0,6$
200-300	17,5	17,3	18,0	17,2	17,1	17,4	0,4	2,3	$\pm 1,1$
300-400	19,6	19,9	19,0	20,3	19,9	19,7	0,4	2,0	$\pm 1,1$
400-500	26,3	26,0	26,8	26,6	26,4	26,4	0,3	1,1	$\pm 0,8$
500-600	17,0	17,3	18,5	18,2	17,8	17,8	0,6	3,4	$\pm 1,6$
600-700	2,1	2,0	1,0	1,5	1,5	1,6	0,4		$\pm 1,1$
20-400						54,2	0,7		$\pm 1,9$
400-700						45,8	0,8		$\pm 2,2$

Для объединенных диапазонов потерь массы 20–400°C (разложение периферийной части макромолекулы) и 400–700°C (разложение «ядра» макромолекулы) были получены стандартные отклонения по правилу суммирования дисперсий отдельных диапазонов и вычислены соответствующие значения доверительных интервалов $\pm 1,9\%$ и $\pm 2,2\%$.

Систематическая погрешность количественного ЯМР анализа является не значимой в соответствии с многочисленными литературными данными по анализу индивидуальных органических веществ, многие из которых могут быть фрагментами ГК [10]. Корректные условия записи количественных ЯМР спектров для ГК и подобных им природных объектов приводятся в работах [11, 12], и именно эти условия использовались нами.

Была также проведена десятикратная компьютерная обработка спектра ЯМР ^{13}C этого же образца ГК низинного торфа, включающая правку фазы, базовой линии и ручное интегрирование. Результаты представлены в табл. 3. Стандартное отклонение, полученное по этим данным, позволяет оценить расхождение параллельных определений, обусловленное субъективными особенностями оператора, проводящего обработку и интегрирование спектра ЯМР, но не включает погрешности ЯМР спектрометра, которые подробно обсуждаются в литературе [11]. Относительное стандартное отклонение по всем интервалам интегрирования составляет 0,7–2,9 %, максимальное – 2,9 % – для области карбоксильного углерода, минимальное – 0,7 % – для ароматического.

Таблица 3

Сходимость анализа при определении фрагментного состава ГК торфа по данным ЯМР ^{13}C

№ п/п	Карбоксильный углерод 160-180 м.д., %	Ароматический углерод 90-160 м.д., %	Полисахаридный углерод 65-90 м.д., %	Алифатический углерод 0-65 м.д., %
1	13,4	42,8	13,7	30,4
2	14,1	42,9	13,7	29,4
3	13,9	42,6	13,5	30,1
4	14,3	42,3	14,1	29,2
5	13,5	42,9	13,6	30,0
6	14,0	43,0	14,0	29,0
7	13,9	42,7	13,7	29,8
8	12,8	43,0	13,5	30,8
9	13,5	43,4	13,8	29,2
10	13,8	42,3	13,8	30,1
Среднее значение, \bar{X}	13,7	42,8	13,7	29,8
Стандартное отклонение, S_n	0,4	0,3	0,2	0,6
$S_n, \%$	2,9	0,7	1,5	2,0
Доверит интервал, $\bar{X} \pm \pm tS, p=0,95, m=10, t=2,3$	$13,7 \pm 0,4$	$42,8 \pm 0,3$	$13,7 \pm 0,2$	$29,8 \pm 0,6$

Таким образом, получены доверительные интервалы, в которых изменяются параметры образца ГК при анализе его различными методами, а именно: при определении элементного состава – $\text{C} \pm 0,44\%$, $\text{H} \pm 0,19\%$, $\text{N} \pm 0,17\%$; при термогравиметрическом анализе – (потеря массы в интервале 20–400°C) $\pm 1,9\%$, (потеря массы в интервале 400–700°C) $\pm 2,2\%$; при определении фрагментного состава по данным ЯМР ^{13}C – $\text{C}(\text{карбоксильный}) \pm 0,9\%$, $\text{C}(\text{ароматический}) \pm 0,7\%$, $\text{C}(\text{полисахаридный}) \pm 0,5\%$, $\text{C}(\text{алифатический}) \pm 1,4\%$.

Значит, если параметры состава ГК отлича-

ются в пределах представленных доверительных интервалов, то отличие может быть обусловлено лишь погрешностью методов определения.

Оценка внутрилабораторной прецизионности определения состава ГК при одинаковых условиях выделения.

Для проведения такого рода оценки было выделено 5 образцов ГК торфа низинного параллельно по стандартной методике. Стандартная методика выделения ГК описана, например, в [6] и включает:

- декальцинирование образца 10 % HCl ;
- экстракцию ГК 0,1 н NaOH ;

- осаждение гуминовых кислот минеральной кислотой.

Результаты определения элементного состава и их статистическая обработка представлены в табл. 4.

Таблица 4

Внутрилабораторная прецизионность определения элементного состава ГК торфа, выделенных по стандартной методике

Образец	C*, мас. %	H*, мас. %	N**, мас. %
1	52,78	5,07	3,45
2	52,40	5,10	3,50
3	53,05	4,75	3,44
4	52,86	5,09	3,42
5	53,78	5,36	3,51
Среднее значение, X	53,0	5,1	3,5
Стандартное отклонение, S _n	0,5	0,2	0,04
S _r , %	1,0	4,3	1,2
Доверит. интервал, X ± tS. p=0,95, m=5, t=2,78	53,0±1,4	5,1±0,6	3,5±0,1

* - среднее из четырех параллельных определений

** - среднее из двух параллельных определений

Максимальное S_r = 4,3 % в данном случае проявляется для водорода, минимальное – 1% – для

углерода. Для этих двух элементов S_r возрастает в 2 раза по сравнению с данными табл. 1, а для азота этот показатель даже уменьшается. Видимо, азот входит в состав весьма стабильных фрагментов структуры макромолекулы, не подвергающихся изменениям в зависимости от небольших различий в процессе выделения ГК. В то время как углерод и, особенно, водород, частично входящие в «периферийную» подвижную часть макромолекулы, очень чутко реагируют на небольшие колебания в концентрациях используемых реагентов, различия в режимах перемешивания и другие мелкие нюансы процесса выделения. Таким образом, даже набор стандартных операций по выделению ГК, выполненный одним и тем же сотрудником в одной лаборатории, только в разной посуде, приводит к довольно заметным расхождениям в элементном составе, которые, безусловно, необходимо учитывать при дальнейших исследованиях ГК и их сравнении друг с другом.

ИК - спектры при использовании одного и того же способа выделения ГК получаются совершенно идентичными по набору полос и близкими по значению пропускания.

Результаты определения фрагментного состава по данным ЯМР ¹³C и их статистическая обработка представлены в табл. 5.

Таблица 5

Внутрилабораторная прецизионность определения фрагментного состава ГК торфа, выделенных по стандартной методике

№ образца ГК	Карбоксильный угле- род 180 м.д., %	Ароматический угле- род* 90-160 м.д., %	Полисахаридный угле- род* 65-90 м.д., %	Алифатический угле- род* 0-65 м.д., %
1	9,7	39,8	15,9	34,7
2	11,3	39,2	15,7	33,8
3	10,0	40,3	15,6	34,2
4	9,4	38,2	16,8	35,7
5	11,6	37,4	15,1	35,9
Среднее значение, X	10,4	39,0	15,8	34,9
Стандартное отклонение, S _n	1,0	1,2	0,6	0,9
S _r , %	9,5	3,0	3,9	2,6
Доверит. интервал, X ± tS. p=0,95, m=5, t=2,78	10,4±2,8	39,0±3,3	15,8±1,7	34,9±2,5

* - среднее из 5 параллельных определений

Стандартное отклонение по всем интервалам интегрирования увеличилось по сравнению с данными, приведенными в табл. 3, а именно: для области карбоксильного углерода от 0,6 % до 1 %, для области ароматического углерода от 0,2 % до

1,2 %, для области полисахаридного углерода от 0,2 до 0,6, для области алифатического углерода от 0,4 % до 0,9 %. В соответствии с этим увеличиваются и доверительные интервалы, в которых изменяются относительные содержания углеро-

да в соответствующих фрагментах структуры.

Таким образом, определены доверительные интервалы ($P = 0,95$, $m = 5$), в которых изменяются параметры элементного и фрагментного состава ГК, если они выделены одним и тем же методом, а именно: при определении элементного состава – $C \pm 1,4\%$, $H \pm 0,6\%$, $N \pm 0,1\%$; при определении фрагментного состава по данным ЯМР ^{13}C – C (карбоксильный) $\pm 2,8\%$, C (ароматический) $\pm 3,3\%$, C (полисахаридный) $\pm 1,7\%$, C (алифатический) $\pm 2,5\%$.

Необходимо отметить увеличение относительного стандартного отклонения и доверительных интервалов при анализе разных образцов ГК, даже при условии соблюдения стандартных условий их выделения из одного и того же объекта. Следовательно, при дальнейшем анализе ГК необходимо учитывать, что если параметры состава ГК отличаются в пределах представленных

доверительных интервалов, то отличие может быть обусловлено лишь суммарной погрешностью методов определения и выделения, а не факторами гумусообразования.

Зависимость состава и структурных особенностей ГК низинного торфа от способа выделения.

В качестве наглядного примера использования полученных доверительных интервалов была рассмотрена значимость отличий образцов ГК, выделенных из одного и того же сырья (низинный торф) методами, отличающимися от стандартного. Условия выделения приведены в табл. 6. Следует подчеркнуть, что экстракция ГК проводилась во всех случаях 0,1н NaOH, отличались, в основном, начальные стадии деминерализации (декальцинирования) и температурные режимы разных стадий.

Таблица 6

Влияние условий выделения на выход гуминовых кислот из торфов

Номер образца	Условия выделения ГК			Выход ГК, мас. %
	Декальцинирование	Экстракция	Осаждение	
1	10% HCl	0,1н NaOH	2н HCl	8,9
2	10% HCl	0,1н NaOH	конц. H_2SO_4	8,9
3	нет	0,1н NaOH	конц. H_2SO_4	5,3
4	нет	0,1н NaOH, 90°C	конц. H_2SO_4	20,9
5	10% HCl, пар 130°	0,1н NaOH	конц. HCl	1,5
6	10% HCl, пар 160°	0,1н NaOH	конц. HCl	2,0

Выход ГК изменяется в зависимости от способа выделения от 5,3 до 20,9% масс. Из табл. 6 видно, что, декальцинирование торфа (образцы 1, 2) обработкой HCl несколько увеличивает количественный выход ГК по сравнению с образцом 3, не подвергнутым декальцинированию. А проведение щелочной экстракции торфа с использованием нагревания на водяной бане (образец 4) приводит к увеличению выхода ГК более чем в 2 раза. Обработка исходных ГК перегретым паром при 130° и 160°C снижает их выход (образцы 5, 6).

Оценка изменений в составе ГК дана на основании данных элементного анализа, ИК и ЯМР спектроскопии. Как видно из табл. 7, на массовое содержание углерода в ГК наибольшее влияние оказывает стадия декальцинирования, поскольку различия наблюдаются между парами образцов 1 и 2, 3 и 4, 5 и 6, отличающихся именно этой стадией. Массовая доля водорода одинакова для всех шести образцов в пределах полученных доверительных интервалов и не зависит от используемых вариантов методики выделения. По содержанию же азота идентичными оказались об-

разцы 2, 5 и 6, остальные, в том числе даже 1 и 2 значительно отличаются, т.е. массовая доля азота очень чувствительна ко всем стадиям методики выделения.

Сравнительное исследование ИК-спектров ГК торфов показало хорошо выраженную общность их спектров, что свидетельствует об общей модели построения молекул. Согласно литературным данным [5], основными полосами ИК спектров являются: полосы при 3500 - 3400 cm^{-1} , относящиеся к гидроксилсодержащим соединениям, 2920, 1460 и 730 - 720 cm^{-1} - к длинным метиленовым цепочкам, 2870 cm^{-1} - к метильным концевым группам. Полосы поглощения при частотах 1720-1725 cm^{-1} соответствуют карбонилсодержащим соединениям, 1610, 1510 и 1380 cm^{-1} свидетельствуют о наличии бензоидных структур ($C = C$), 1270 cm^{-1} - $C-O$ -связей, 1150 cm^{-1} - OH -углеводов, 1070 cm^{-1} - $C-O$ -углеводов. Чтобы проиллюстрировать различия ИК спектров макромолекул ГК, полученных разными способами, данные спектры были нормированы на полосу ароматических $C = C$ связей 1610 cm^{-1} .

Таблица 7

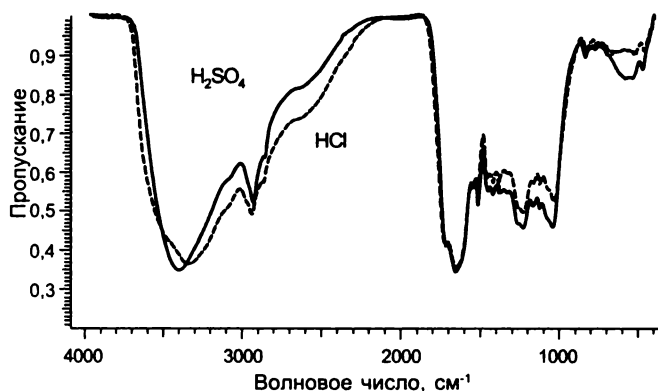
Элементный состав гуминовых кислот, выделенных разными способами

№**	% золы	Элементный состав на беззольную навеску*, мас. %		
		C±1,4	H±0,6	N±0,1
1	2,1	52,1	5,4	3,1
2	4,6	52,4	5,6	3,6
3	отс	48,1	5,2	2,8
4	1,6	48,4	5,2	3,2
5	2,2	57,8	5,1	3,7
6	2,3	58,2	5,2	3,7

* - среднее значение из 2-4 параллельных определений.

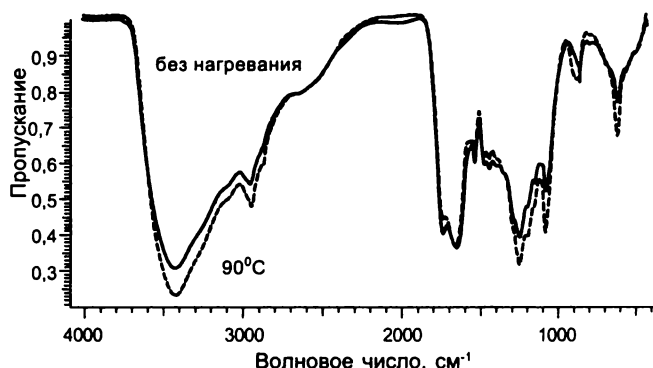
** - номер образца соответствует табл.6

Для образцов ГК 1 и 2, осажденных 2 н HCl и конц. H_2SO_4 , соответственно, не было найдено различий в количестве полос ИК спектров и значениях пропускания. Некоторое уменьшение значения пропускания для полос в диапазоне $1000-1500\text{ см}^{-1}$ для образца 1 находится в пределах изменений ИК спектров, получаемых параллельно для одного и того же образца ГК. (рис. 1)

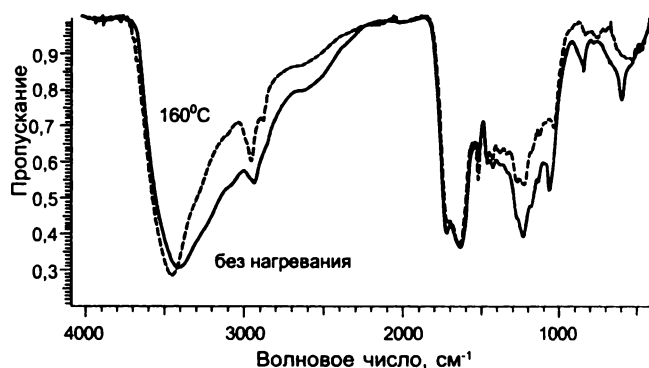
Рис.1. ИК спектры образцов 1 (HCl, прерывистая линия) и 2 (H_2SO_4 , сплошная линия)

Образцы ГК 3 и 4 не подвергались предварительной деминерализации и характеризуются по сравнению с образцами 1 и 2 повышением относительного содержания гидрофильных фрагментов, увеличивается пропускание полос $-OH$ -групп (3400 см^{-1}) и $C-O$ - групп (1270 и 1050 см^{-1}). При экстракции ГК на водяной бане (образец 4) происходит гидролиз и соответствующее уменьшение относительного количества карбоксильных групп по сравнению с образцом 3, однако, относительное содержание OH -групп, полисахаридных и эфирных $C-O$ - групп в образце 4 выше (рис.2).

При обработке образцов 5, 6 перегретым паром резко падает выход ГК, что свидетельствует об их деструкции и последующем переходе получаемых фрагментов ГК в водорастворимую часть экстракта, не осаждаемую кислотой.

Рис.2. ИК спектры образцов 3 (без нагревания, сплошная линия) и 4 (90°C , прерывистая линия)

В составе выделенных таким образом ГК наиболее существенно изменяется по сравнению с остальными образцами количество алкильных и углеводных фрагментов относительно конденсированных ароматических систем (рис.3). Значимых различий в ИК спектрах образцов 5 (130°) и 6 (160°) не наблюдается.

Рис.3. ИК спектры образцов 3 (без нагревания, сплошная линия) и 6 (160°C , прерывистая линия)

Детальная оценка изменений фрагментного состава ГК, выделенных разными способами приведена в табл.8. Из данных таблицы следует, что стадия осаждения ГК разными минеральными кислотами (образцы 1, 2) не влияет на фрагментный состав ГК, так как в пределах полученных достоверных интервалов относительное

содержание в ГК алифатических, полисахаридных, ароматических и карбоксильных фрагментов совпадает. Полностью идентичен этим двум образцам по фрагментному составу и образец 4. Значимые отличия для всех интервалов интегрирования ЯМР спектров имеет лишь образец 3. Существенному гидролизу и вымыванию подверга-

ются полисахариды и карбоксильные группы образцов 5 и 6, за счет этого происходит увеличение относительного содержания ароматического углевода. В относительном содержании алифатических фрагментов всех шести образцов значимых различий не наблюдается.

Таблица 8

Фрагментный состав ГК низинного торфа по данным ЯМР ^{13}C (отн.%)

Образец*	Карбоксильный 110-200 мд, $\pm 2,8\%$	Ароматический 110-160 мд, $\pm 3,3\%$	Полисахаридный 65-110 мд, $\pm 1,7\%$	Алифатический 0-65 мд, $\pm 2,5\%$
1	10,6	37,7	15,3	36,3
2	10,4	36,8	15,1	37,5
3	13,6	43,3	13,6	29,5
4	12,1	37,1	14,2	36,6
5	10,0	45,2	9,0	35,9
6	9,0	44,3	9,2	37,6

* - номер образца соответствует таблице 6

Таким образом, в результате проведенных исследований было показано, что изменения любой стадии выделения ГК приводят к значимым различиям в тех или иных параметрах состава макромолекул, следовательно, для проведения корректного сравнительного анализа ГК разного происхождения необходимо использовать строго стандартизированные по возможно большему числу параметров методики выделения.

Выводы

1. Установлены доверительные интервалы ($P = 0,95$, $m = 5$), в которых изменяются параметры элементного и фрагментного состава ГК, если они выделены стандартным методом, а именно: при определении элементного состава - $C \pm 1,4\%$, $H \pm 0,6\%$, $N \pm 0,2\%$; при определении фрагментного состава (по данным ЯМР ^{13}C) - $C(\text{карбоксильный}) \pm 2,8\%$; $C(\text{ароматический}) \pm 3,3\%$; $C(\text{поли-$

сахаридный) $\pm 1,7\%$; $C(\text{алифатический}) \pm 2,5\%$. Следовательно, при дальнейшем анализе ГК необходимо учитывать, что если параметры состава ГК отличаются в пределах представленных доверительных интервалов, то отличие может быть обусловлено лишь суммарной погрешностью методов определения и выделения, а не исследуемыми факторами гумусообразования.

2. Изменения любой стадии выделения ГК приводят к значимым различиям в тех или иных параметрах состава макромолекул. Следовательно, для проведения корректного сравнительного анализа ГК разного происхождения необходимо использовать строго стандартизированные по возможно большему числу параметров методики выделения.

Работа выполнена при поддержке СО РАН (интеграционный проект №35)

ЛИТЕРАТУРА

1. Тихова В.Д. Различия гуминовых кислот почв по данным термического анализа и спектроскопии ЯМР ^{13}C / В.Д.Тихова, М.М.Шакиров, В.П.Фадеева, М.И.Дергачева // Журнал прикладной химии. 1998. Т.71, №7. С.1173-1176.
2. Тихова В.Д. Исследование гуминовых кислот ископаемых почв аналитическими методами / В.Д.Тихова, М.М.Шакиров, В.П.Фадеева и др. // Журнал прикладной химии. 2001. Т.74, Вып.8. С.1343-1347.
3. Тихова В.Д. Анализ гуминовых кислот зонально-генетического ряда почв сибирского региона комплексом инструментальных методов / В.Д.Тихова, М.М.Шакиров, В.П.Фадеева, М.И.Дергачева // Сб. науч. тр. II Международной конференции «Гуминовые вещества в биосфере», Москва, 2003. М.: Изд-во Московского университета, 2004. С.283-287.
4. Тихова В.Д. Анализ элементного и фрагментного состава гуминовых кислот почв Сибири комплексом инструментальных методов. Дисс.... канд. хим. наук. Новосибирск, 2003. 138 с.
5. Орлов Д.С. Гумусовые кислоты почв и общая теория гумификации. М.: Изд-во МГУ, 1990. 325 с.

6. Орлов Д.С. Практикум по биохимии гумуса / Д.С.Орлов, Л.А.Гришина, Н.Л.Ерошичева. М.: Изд-во МГУ, 1969. 157 с.
7. МВИ НИОХ № 01-95. Методика выполнения измерений содержания углерода, водорода и азота в органических химических продуктах с использованием автоматического элементного анализатора фирмы Карло Эрба.
8. Тихова В.Д. Об оценке метрологических характеристик методик классического и автоматического определения углерода, водорода и азота в органических веществах / В.Д.Тихова, И.М.Морякина, В.П.Фадеева // Сибирский химический журнал. 1991. Вып.1. С.50-54.
9. Перминова И.В. Анализ, классификация и прогноз свойств гумусовых кислот. Дисс.... д-ра. хим. наук. Москва, 2000. 319 с.
10. L.D.Field, S.Sternhell. Analytical NMR. ED.-Chichester A.O.: WILEY, 1989. 250 P.
11. Калабин Г.А. Количественная спектроскопия ЯМР природного органического сырья и продуктов его переработки / Г.А.Калабин, Л.В.Каницкая, Д.Ф.Кушнарев. М.: Химия, 2000. 408 с.
12. Preston C.M. Carbon-13 NMR for a humic and a fulvic acid: Signal-to-noise optimization, quantitation, and spin-echo techniques / C.M.Preston, B.A..Blackwoll // Soil Sci. 1985. V.139. P. 88-96.

* * * * *

METROLOGICAL ASPECTS OF HUMIC ACID ANALYSES

V.D.Tikhova, V.P.Fadeeva, M.M.Shakirov, N.V.Yudina

The estimation of metrological (statistical) characteristics of such research methods for humic acids, as elemental CHN-analysis, thermal analysis, partial analysis with the use of ^{13}C NMR spectroscopy is carried out. As a result of researches the parameters of repeatability and precision for all mentioned methods are established. The received data allow to estimate reliability of distinctions between humic acids, received with some deviations from a standard technique, and also between humic acids of various genesis.
